

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : <p style="text-align: center;">G01N 33/68, 33/58</p>	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/19355 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 29. Mai 1997 (29.05.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP96/05141 (22) Internationales Anmeldedatum: 21. November 1996 (21.11.96) (30) Prioritätsdaten: 195 43 569.9 22. November 1995 (22.11.95) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: LÖ. Atou [SN/DE]; Goldregen- weg 38 B, D-70565 Stuttgart (DE). (74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D- 81679 München (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(54) Title: DETECTION OF THE END-POSITION SIALIC ACID GROUPS OF THE HUMAN TRANSFERRIN MOLECULE (54) Bezeichnung: BESTIMMUNG DER ENDSTÄNDIGEN SIALINSÄURERESTE DES HUMAN-TRANSFERRIN-MOLEKÜLS (57) Abstract <p>The object of the present invention is a process for detecting end-position sialic acid groups of human transferrin using the sandwich principle. The process is characterised in that the sample fluid containing the human transferrin is incubated with a first receptor capable of bonding specifically with human transferrin, the complex thus formed is separated from the sample fluid, incubated with a second receptor capable of binding specifically to end-position sialic acid groups of human transferrin, the second receptor being bound or capable of binding to a marker, and the complex of first receptor, human transferrin and second receptor is determined by the marker. In one embodiment, the claimed process facilitates determination of sialic acid-deficient human transferrin in body fluids.</p> (57) Zusammenfassung <p>Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Bestimmung endständiger Sialinsäurereste von Human-Transferrin nach einem Sandwich-Prinzip, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man die das Human-Transferrin enthaltende Probenflüssigkeit mit einem ersten, spezifisch mit Human-Transferrin bindefähigen Rezeptor inkubiert, den gebildeten Komplex von der Probenflüssigkeit abtrennt, mit einem zweiten, spezifisch mit endständigen Sialinsäureresten von Human-Transferrin bindefähigen Rezeptor inkubiert, wobei der zweite Rezeptor an eine Markierung gebunden oder damit bindefähig ist, und den Komplex aus erstem Rezeptor, Human-Transferrin und zweitem Rezeptor über die Markierung bestimmt. In einer Ausführungsform ermöglicht das erfindungsgemäße Verfahren die Bestimmung von Sialinsäure-defizientem Human-Transferrin in Körperflüssigkeiten.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

Bestimmung der endständigen Sialinsäurereste des Human-Transferrin-Moleküls

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft die Bestimmung der endständigen Sialinsäurereste von humanem Transferrin. In einer Ausführungsform betrifft sie die Quantifizierung der endständigen Sialinsäure-Reste des Transferrin-Moleküls in Proben menschlicher Körperflüssigkeiten und insbesondere eine Interpretation von Veränderungen der chemischen Struktur des Transferrins, wie beispielsweise durch regelmäßigen und mißbräuchlichen Alkoholkonsum verursacht.

Zur Diagnose von Alkoholmißbrauch bzw. Alkoholabhängigkeit sind in der Medizin eine Reihe von Indikatoren bekannt. Die sogenannten "State-Marker" erlauben eine Abschätzung bezüglich der Alkoholaufnahme, wobei in Abhängigkeit des bestimmten Markers die Assoziation über einen kurzen Zeitraum (z.B. Blutalkoholspiegel) oder längerfristig (v.a. diverse Leberenzyme) besteht. Eine ausführliche Übersicht über Alkoholismus und geeignete Marker findet sich in M. Soyka (Herausgeber, Biologische Alkoholismuskmarker, Chapman and Hall (1995)).

Als ein geeigneter Marker mit relativ hoher Spezifität hat sich eine abnorme Transferrinvariante herausgestellt. Die bisher veröffentlichten wissenschaftlichen Arbeiten haben gezeigt, daß diese Molekülveränderung in Form von fehlendem oder reduziertem Gehalt an Sialinsäureresten des Transferrin-Moleküls auftritt.

Das humane Serum-Transferrin ist ein Glykoprotein mit einem relativen Molekulargewicht von ca. 77.000 g/Mol und besteht aus einer einzelnen Peptidkette von 679 Aminosäuren, an die zwei Oligosaccharidketten angeheftet sind, die aus N-Acetylglucosamin, Mannose und Galaktose bestehen. Diese

- 2 -

Kohlehydratketten besitzen zwei bis drei Antennen, an deren letzten Glied (Galactose) jeweils ein Sialinsäurerest gebunden ist.

Regelmäßiger Alkoholmißbrauch beeinträchtigt den Mechanismus der Übertragung der Sialinsäuren auf das Transferrin und es entstehen in Folge vermehrt Isoformen des Transferrins mit weniger als den normalerweise vier bis sechs endständig gebundenen Sialinsäureresten (desialinisiertes Transferrin, Sialinsäure-defizientes Transferrin, sialic deficient transferrin, SDT).

Gemäß De Jong et al. (1980) setzt sich die häufigste isoforme Struktur des Tetrasialotransferrins (Fig. 1) wie folgt zusammen:

4 endständige N-Acetyl-Sialinsäure-Reste, 4 Galactose-Reste, 8 N-Acetyl-Glucosamin-Reste und 6 Mannose-Reste in beiden Oligosaccharid-Seitenketten des Transferrinmoleküls.

Aus dem Stand der Technik bekannte Verfahren beruhen im wesentlichen auf der Auftrennung der unterschiedlich glykosylierten Transferrinderivate aufgrund ihrer Ladung, wie beispielsweise durch isoelectric focusing oder chromatographische Verfahren. Von den bekannten Methoden sind anzuführen:

1. Die 'Isoelectric Focusing'-Methode

Elektrophoretische Trennung der Isotransferrine entsprechend ihrem isoelektrischen Punkt (PI 6,1 - 5,1).

(Helena Stibler et Stefan Borg, Pharmacol. Biochem. Behav. 1980, 13, Suppl. 1, 47-51).

2. Die chromatografische Methode mittels Ionenaustauscher

(Helena Stibler et al., Clinical and Experimental Research Sept./Oct. 1986, Vol. 10. No. S, 535-543).

3. Die HPLC-Methode,

- 3 -

Sättigung der Transferrine mit einem Eisensalz und anschließender Extraktion auf Kolonne, dann erfolgt eine densitometrische Bestimmung.

(Strahler et al., J. of chromatographie 266,1983, 281-289).

4. Isokratische HPLC-Methode

Beruhrt auf der Trennung der Isotransferrine mittels kationischer Puffer.

(Joustra Marius et al., Patent Nr: EP 0 172 217 B1), (HPLC-Verfahren nach Jan Jeppson et al., Clin.Chemistry 39/10; 2115-2120 (1993))

5. Turbidimetrische Methode der Firma AXIS

Basiert ebenfalls auf der Sättigung des Isotransferrins mittels Eisensalz oder einer heterogenen Immunoanalyse mit Trennung auf Kolonne gefolgt von einer turbidimetrischen Messung.

(Patent: WO 99119983 A 911226)

6. Die immunoenzymatische EIA-Methode durch eine Konjugation von Pharmacia

Verwendet einen monoklonalen Antikörper nach Sättigung des Isotransferrins mittels Eisensalz und Säulentrennung.

(O. Mårtenson et al.).

7. Die RIA-Methode von Pharmacia:

Chromatografisch mittels Ionenaustauscher; nach Sättigung des Isotransferrins durch ein Eisensalz und quantitativ bestimmt durch Radio-Immuno-Analyse.

Die genannten Verfahren sind jedoch für den Anwender noch nicht zufriedenstellend. Problematisch ist insbesondere das Auftreten von Fehldiagnosen sowie eine sehr aufwendige Versuchsdurchführung.

Weiterhin ist aus dem Stand der Technik eine als Lectine bezeichnete Klasse von Proteinen oder Glykoproteinen bekannt, die an bestimmte Kohlehydratkonfigurationen bzw. an

- 4 -

Glykoproteine, die solche Kohlehydratkonfigurationen tragen, binden können. Derartige Lectine wurden auf Basis ihrer Spezifität für bestimmte Kohlehydrate, beispielsweise zur blutgruppenspezifischen Agglutinierung von Erythrozyten eingesetzt.

Die der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Aufgabe bestand darin, ein Verfahren bereitzustellen, das die rasche und einfache Bestimmung endständiger Sialinsäurereste von Human-Transferrin gestattet.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren zur Bestimmung endständiger Sialinsäurereste von Human-Transferrin in einer Probenflüssigkeit nach einem Sandwich-Prinzip, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man die Probenflüssigkeit mit einem ersten, spezifisch mit Human-Transferrin bindefähigen Rezeptor inkubiert, den gebildeten Komplex von der Probenflüssigkeit abtrennt, mit einem zweiten, spezifisch mit endständigen Sialinsäureresten von Human-Transferrin bindefähigen Rezeptor inkubiert, wobei der zweite Rezeptor an eine Markierung gebunden oder damit bindefähig ist, und den Komplex aus erstem Rezeptor, Human-Transferrin und zweitem Rezeptor über die Markierung bestimmt.

Im allgemeinen ist es aufgrund der bekannten und bewährten Technologie bevorzugt als ersten Rezeptor einen anti-Transferrin-Antikörper einzusetzen. Bevorzugt wird als erster Rezeptor ein polyklonaler anti-Transferrin-Antikörper eingesetzt. Derartige Antikörper sind kommerziell verfügbar (z.B. Sigma, No. T2027). Weiterhin sind jedoch andere mit Human-Transferrin spezifische Rezeptoren geeignet, soweit durch diese die Bindung von zweitem Rezeptor an die Sialinsäurereste im wesentlichen nicht beeinträchtigt wird. Beispielsweise ist die Verwendung von humanem Transferrin-Rezeptor denkbar.

- 5 -

Der zweite Rezeptor ist bevorzugt ein Lectin und am meisten bevorzugt Sambucus nigra-Lectin, dessen Herstellung von Brökert et al. (Biochem. J. 221, 103-109 (1984)) beschrieben wurde.

In einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist der erste Rezeptor an eine Festphase gebunden, wodurch das Transferrin bei der Inkubation an der Festphase fixiert wird. In einer anderen Ausführungsform kann der erste Rezeptor jedoch auch in Lösung vorliegen, aber über ein spezifisches Bindepaar, dessen einer Partner an die Festphase gebunden ist und dessen zweiter Partner an den Rezeptor gebunden ist, mit einer Festphase bindefähig sein. Geeignete Bindepaare sind dem Fachmann bekannt.

Als Festphase wird zweckmäßig eine Wand eines Reaktionsgefäßes, wie etwa ein Probenröhrchen, eine Mikrotiterplatte oder eine Küvette, verwendet. Weiterhin kann die Festphase aus teilchenförmigem Material, wie etwa Polystyrol- oder Magnetbeads, bestehen.

Ebenso kann der zweite Rezeptor direkt an die Markierung gebunden sein oder mittels eines spezifischen Bindungspaares mit der Markierung bindefähig sein. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das spezifische Bindungspaar Biotin und Streptavidin bzw. Avidin, wobei dann typischerweise der zweite Rezeptor biotinyliert ist und die Markierung Streptavidin/Avidin trägt.

Die Inkubationen mit erstem Rezeptor und zweitem Rezeptor werden jeweils während eines Zeitraums von 10 bis 60 min, bevorzugt von 20 bis 40 min und bei einer Temperatur von 10 bis 40°C durchgeführt. Eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur liefert gute Ergebnisse.

Als Markierung für den zweiten Rezeptor sind im wesentlichen alle Nachweisverfahren geeignet, die in der Technik üblicherweise im Zusammenhang mit Immunassays verwendet werden.

- 6 -

Derartige Verfahren sind dem Fachmann bekannt und brauchen daher nicht ausführlich erläutert zu werden. Sie umfassen insbesondere enzymatische Verfahren, d.h. Verfahren, bei denen die Markierung ein Enzym ist und der Nachweis über die Bestimmung eines Substrats erfolgt. Übliche Enzyme, die für einen derartigen Zweck verwendet werden, umfassen z.B. Phosphatasen, wie etwa alkalische Phosphatase, Oxidasen, Peroxidasen, Dehydrogenasen wie etwa Glucose-6-Dehydrogenase, Hydrolasen, wie etwa Urease etc. Die enzymatische Reaktion erzeugt typischerweise ein chromogenes, lumineszierendes oder fluoreszierendes Substrat, das dann geeignet zumeist über photometrische Verfahren bestimmt werden kann. Geeignete Chromogene umfassen beispielsweise ABTS (2,2'-Azino-bis-(3-ethyl)-benzthiazolin-6-sulfonsäure), Orthophenyldiamin, Tetramethylbenzidin, 5-Amino-Salicylsäure etc. Enzymatische Verfahren umfassen auch z.B. eine durch die Substratreaktion verursachte Veränderung eines chemischen oder physikalischen Parameters, wie etwa der Lichtabsorption. Die Sialinsäure-Reste können somit auch durch UV-Methoden mit Alkohol-Dehydrogenase, Glucose-6-Dehydrogenase etc. und mittels den Coenzymen NAD, NADP etc. bestimmt werden oder mittels Verwendung einer Diaphorase in Anwesenheit von NADP und dem Chromogen Jodo-Nitrotetrazoliumviolett, um ein farbiges Formazan-Derivat zu bilden.

Neben einer Enzymmarkierung sind selbstverständlich andere Markierungsarten, wie etwa eine Radio-, Fluoreszenz- oder Lumineszenzmarkierung möglich; eine radioaktive Markierung ist jedoch aus Praktikabilitätsgründen nicht bevorzugt. Die Durchführung eines Immunofluoreszenztestes ist beispielsweise bei Verwendung eines Konjugats von zweitem Rezeptor mit IFTC (Fluoreszin-isothiocyanat) möglich.

Als Probenflüssigkeit, die das zu bestimmende Transferrin enthält, wird üblicherweise eine Körperflüssigkeit, wie etwa Blut, Serum, Urin, Liquor, Glaskörperflüssigkeit, Galle, Aszites-Flüssigkeit etc. verwendet werden. Gegebenenfalls wird

- 7 -

eine durch chemische oder physikalische Behandlung modifizierte Körperflüssigkeit verwendet, die jedoch bevorzugt frei von Antikoagulantien ist. Bevorzugt ist die Körperflüssigkeit Vollblut oder Serum.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Bestimmung von Sialinsäure-defizientem Transferrin in Körperflüssigkeiten, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man

- (a) an einer Probe einer Körperflüssigkeit eine Bestimmung nach einem Verfahren eines der vorhergehenden Ansprüche durchführt,
- (b) eine Bestimmung von endständigen Sialinsäureresten an mindestens einem Standard durchführt, der eine Substanz, umfassend mit dem zweiten Rezeptor bindefähige Sialinsäurereste in definierter Menge enthält, und
- (c) den Gehalt von Sialinsäure-defizientem Transferrin auf Basis der Meßgrößen von Schritt (a) und Schritt (b) ermittelt.

Bevorzugt wird Schritt (b), d.h. die Bestimmung der Meßgröße für einen Standard mehrmals durchgeführt, wobei die Standards jeweils eine unterschiedliche Menge von mit dem zweiten Rezeptor bindefähigen Sialinsäureresten enthalten. Besonders bevorzugt werden drei bis sieben, am meisten bevorzugt fünf bis sechs Messungen mit unterschiedlichen Standards durchgeführt und aus den erhaltenen Ergebnissen eine Eichkurve ermittelt. Durch den Vergleich des gemessenen Wertes für die Probenflüssigkeit mit der Eichkurve läßt sich der Gehalt des Sialinsäure-defizienten Transferrins mit guter Genauigkeit bestimmen.

Wie für den Fachmann offensichtlich ist, werden bevorzugt geeignete Negativ- oder/und Positivkontrollproben parallel mitbestimmt.

Gemäß einer Ausführungsform verwendet man einen Standard, der Transferrin mit einer definierten Menge von Sialinsäureresten

- 8 -

enthält. Darunter werden Körperflüssigkeiten, beispielsweise gepoolte Körperflüssigkeiten sowie geeignet formulierte Zusammensetzungen verstanden. Geeignete Konzentrationen der Sialinsäurereste in den Standards für die Erstellung der Eichkurve liegen in einem Bereich von 0 bis 50 $\mu\text{mol/dl}$, bevorzugt von 2,5 bis 25 $\mu\text{mol/dl}$.

Gemäß einer anderen Ausführungsform enthält der Standard eine von Transferrin verschiedene Substanz mit einer definierten Menge von mit dem zweiten Rezeptor bindefähigen Sialinsäureresten. Ein Beispiel für eine derartige Substanz ist ein festphasenseitiges Mucin oder/und ein festphasenseitiges Oligosaccharid mit definiertem Gehalt von mit dem zweiten Rezeptor bindefähigen Sialinsäureresten, wie z.B. ein von Sigma erhältliches Mucin (Sigma No. M3895, Mucin von Bovine Submaxillary Glands). Der Begriff "festphasenseitig" wird in dieser Beschreibung in der Bedeutung an eine Festphase gebunden (immobilisiert) oder damit bindefähig (immobilisierbar) verwendet.

Ein weiteres Beispiel ist N-Acetylneuramin-Lacto-N-neo-Tetraose c (α Neu 5 AC-(2-6)- β Gal-(1-4)- β GlcNAc-(1-3)- β Gal-(1-4)-Glc (Sigma Nr. A4814) in Kombination mit einer mit Concavalin A (Sigma Nr. C7275) beschichteten Festphase (spezifisch für α -D-Glycosyl-Bindungen).

Wenn als Standard eine Transferrin-enthaltende Flüssigkeit verwendet wird, erfolgt die Fixierung von Transferrin an der Festphase mittels erstem Rezeptor. Bei Verwendung eines Standards, der eine von Transferrin verschiedene Substanz enthält, ist wie für den Fachmann offensichtlich die Fixierung der Markierung über einen Komplex aus erstem Rezeptor und Transferrin nicht möglich. In diesem Fall ist daher die Sialinsäurereste-enthaltende Substanz festphasenseitig, d.h. an eine Festphase gebunden oder damit bindefähig.

- 9 -

Das erfindungsgemäße Verfahren ist anwendbar zur Bestimmung von SDT in Proben von Körperflüssigkeiten von männlichen und weiblichen Spendern. Für gesunde Personen wurde in der Literatur ein physiologischer Transferringehalt von 260 mg/dl \pm 15% berichtet. Überraschenderweise ergibt das erfindungsgemäße Verfahren auch für Schwangere korrekte Resultate.

Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung auch die Verwendung eines Lectins, insbesondere von Sambucus nigra-Lectin in einem Verfahren zur Bestimmung von Sialinsäure-defizientem Transferrin.

Da wie bereits eingangs erwähnt das Sialinsäure-defiziente Transferrin ein zuverlässiger Alkoholismusmarker ist, kann das erfindungsgemäße Verfahren die Diagnostik im Zusammenhang mit Alkoholmißbrauch erheblich erleichtern.

Ein nochmals weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Diagnoseverfahren, bzw. die Verwendung des vorstehend genannten Verfahrens zur Diagnose von Alkoholmißbrauch oder Alkoholabhängigkeit. Zur Diagnose wird nach Bestimmung von Sialinsäure-defizientem Transferrin in einer Probe einer Körperflüssigkeit durch Vergleich mit Normalwerten eine pathologische Veränderung des Gehalts der endständigen Sialinsäurereste ermittelt. Dieser Vergleich erfolgt auf herkömmliche Weise, beispielsweise durch Mitführen von Vergleichsproben von Patienten und/oder Gesunden. Alternativ oder zusätzlich kann rechnerisch ermittelt werden, ob der erhaltene Wert innerhalb des Normalbereichs liegt.

Weitere Verwendungsmöglichkeiten in diesem Zusammenhang sind beispielsweise die Früherkennung von regelmäßigem Alkoholabusus und Alkoholismus, die Therapieüberwachung von Entzugspatienten, ein differentialdiagnostischer Einsatz zur Unterscheidung von alkoholinduzierten Erkrankungen (z.B. Leber) von nichtalkoholischen Schäden, eine labordiagnostische

- 10 -

Entscheidungshilfe zur Einleitung einer Alkoholentzugs-Pharmakoprophylaxe in der Intensivmedizin, sowie allgemein in der Rechts- und Arbeitsmedizin, z.B. für gutachterliche Fragestellungen.

Gemäß einem nochmals weiteren Aspekt betrifft die Erfindung auch ein Reagenzienkit, das zur Bestimmung endständiger Sialinsäurereste von Transferrin geeignet ist. Ein derartiges Kit umfaßt in räumlich getrennter Anordnung festphasenseitigen, mit Human-Transferrin spezifisch bindefähigen ersten Rezeptor und markierten oder mit einer Markierung bindefähigen, spezifisch mit endständigen Sialinsäureresten von Human-Transferrin bindefähigen zweiten Rezeptor sowie gegebenenfalls eine mit dem ersten Rezeptor spezifisch bindefähige Festphase, eine mit dem zweiten Rezeptor spezifisch bindefähige Markierung, ein Substrat für die Markierung sowie übliche Hilfs-, Puffer- und Zusatzstoffe.

Der erste Rezeptor ist bevorzugt ein anti-Transferrin-Antikörper, insbesondere ein polyklonaler anti-Transferrin-Antikörper und der zweite Rezeptor ist bevorzugt ein Lectin, insbesondere Sambucus nigra-Lectin.

Gegebenenfalls enthält das Reagenzienkit weiterhin mindestens einen Standard, der eine Substanz, umfassend mit dem zweiten Rezeptor bindefähige Sialinsäurereste in definierter Menge enthält, wie vorstehend beschrieben. Bevorzugt ist diese Substanz N-Acetylneuramin-Lacto-N-neo-Tetraose c (α Neu 5 AC-(2-6)- β Gal-(1-4)- β GlcNAc-(1-3)- β Gal-(1-4)-Glc (Sigma Nr. A4814), welches mit einer Concavalin A (Sigma Nr. C7275) beschichteten Festphase bindefähig ist, oder ein Mucin mit definiertem Gehalt von α -anomerischen (2-6) Sialinsäureresten (z.B. Sigma No. M3895, Mucin von Bovine Submaxillary Glands).

Ein nochmals weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Teststreifen zur qualitativen und semiquantitativen Bestimmung von SDT, umfassend

- 11 -

- (a) eine Probenauftragszone,
- (b) mindestens eine Reaktionszone, enthaltend einen an einer Festphase immobilisierbaren ersten Rezeptor, der mit Human-Transferrin spezifisch bindefähig ist, und einen markierten zweiten Rezeptor, der mit endständigen Sialinsäureresten von Human-Transferrin spezifisch bindefähig ist, und
- (c) eine Nachweiszone zur Immobilisierung von erstem Rezeptor, enthaltend eine mit erstem Rezeptor spezifisch bindefähige Substanz.

Derartige Teststreifen sind dem Fachmann bekannt und bedürfen daher keiner ausführlichen Erläuterung. In kurzen Worten besteht ein derartiger Teststreifen aus einem Material, durch welches eine Probenflüssigkeit, enthaltend eine zu bestimmende Substanz z.B durch Kapillarkraft oder Schwerkraft migrieren kann, und welches bezüglich der zu bestimmenden Substanz inert ist. Nach Auftrag der Flüssigkeit in der Probenauftragszone migriert diese durch eine Reaktionszone, wobei ternäre Komplexe aus dem ersten Rezeptor, Transferrin und dem zweiten, markiertem Rezeptor gebildet werden, die danach in der Nachweiszone immobilisiert werden. Nicht gebundene Reaktanten und Substanzen migrieren über die Nachweiszone hinweg und werden in einer Endzone aufgefangen.

Der erste Rezeptor ist bevorzugt ein anti-Transferrin-Antikörper, insbesondere ein polyklonaler anti-Transferrin-Antikörper. Die Immobilisierung des ersten Rezeptors erfolgt bevorzugt über Biotin und Streptavidin/Avidin. Der zweite Rezeptor ist bevorzugt ein Lectin, insbesondere Sambucus nigra-Lectin. Zur Verwendung in derartigen Teststreifen geeignete Markierungen für den zweiten Rezeptor sind dem Fachmann bekannt und umfassen beispielsweise Goldmarkierung, Silbermarkierung oder Chromogene.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt der Teststreifen weiterhin mindestens eine Kontrollzone zur Negativkontrolle oder/und Positivkontrolle. Eine Negativkontrollzone entspricht

- 12 -

im wesentlichen der Nachweiszone mit dem Unterschied, daß kein Bindungspartner zur Immobilisierung des ersten Rezeptors vorhanden ist. Eine Positivkontrollzone enthält zweckmäßig eine definierte Menge von mit dem zweiten Rezeptor bindefähigen, immobilisierten Sialinsäureresten. Für eine semiquantitative Bestimmung können mehrere Positivkontrollzonen mit unterschiedlichen Mengen von Sialinsäureresten vorhanden sein. Weitere Ausführungsformen und Layouts für den Teststreifen sind aus dem Stand der Technik bekannt.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann darüber hinaus zur Bestimmung endständiger Sialinsäure-Reste sämtlicher natürlicher Proteine verwendet werden, die endständige Sialinsäure-Reste in 2-6-Stellung gebunden an β -Galactose und N-Acetyl-glucosamin enthalten.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird durch die nachfolgenden Beispiele zusammen mit den beigefügten Figuren näher erläutert, in denen:

Figur 1 die Glykosylierung von Tetrasialotransferrin zeigt,

Figur 2 eine Standardkurve zur Auswertung einer Messung nach dem erfindungsgemäßen Verfahren zeigt.

In Figur 1 ist schematisch die Glykosylierung der häufigsten isoformen Struktur des Tetrasialotransferrins gezeigt. Die endständigen Kohlehydratreste sind Sialinsäurereste bzw. Acetylsialinsäurereste, die in α 2-6-Verknüpfung an Galactose gebunden sind, wobei die Galactose wiederum an N-Acetylglucosamin gebunden ist.

Figur 2 zeigt eine Standardkurve, die zur Auswertung einer erfindungsgemäßen SDT-Bestimmung geeignet sind. Wie gezeigt, werden in die Kurve die Werte von Standards mit 5, 10, 15, 20 und 25 $\mu\text{mol/dl}$ SSR (Sialinsäurerest) eingetragen.

- 13 -

Die Vorteile der neuen Methode sind:

1. Hohe Spezifität, denn das Sambucus nigra-Lectin besitzt eine große Affinität für endständige α -anomerische in 2-6-Stellung gebundene Sialinsäuren.
2. Große Sensibilität (von bis zu 5 ng im Test).
3. Sehr gute Reproduzierbarkeit.
4. Sehr hohe Präzision von Tag zu Tag und in der Serie.
5. Im Gegensatz zu den bisherigen Bestimmungsmethoden, die einen großen apparativen Aufwand und erfahrenes Personals erforderten, zeichnet sich dieses voll-immunoenzymatische Verfahren durch seine elegante direkte Bestimmungsmethode aus, die keine aufwendigen physikalisch-chemischen Trennverfahren zur Probenaufbereitung mehr benötigt und damit wesentlich einfacher, leichter verfügbar, sehr schnell durchzuführen und nicht anfällig für Arbeitsfehler in der Probenaufbereitungsphase ist.
6. Große Einfachheit des Testes, der problemlos als semi-quantitativer Test eingesetzt werden kann, der ohne Photometer mit bloßem Auge abgelesen werden kann.
7. Sehr kurze Reaktionszeit von weniger als 2 Stunden für 96 Bestimmungen pro Mikrotiterplatte.

Beispiele

Das in zwei Varianten vorgestellte EIA-Verfahren ist durch die Verwendung des spezifischen Sambucus nigra-Lectins gekennzeichnet, welches eine große Affinität zum α -anomerischen endständigen Sialinsäure-Rest aufweist, welcher in 2-6-Stellung an die Galactose-N-acetyl-glucosamin-Kette gebunden ist.

Die Quantifizierung dieser Sialinsäure-Reste erfolgt in drei Etappen:

1. Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes zwischen dem Transferrin und einem polyklonalen anti-Transferrin-Antikörper, der auf der Platte gebunden ist.

- 14 -

2. Bildung eines zusätzlichen molekularen spezifischen Komplexes zwischen Peroxidase-markiertem Sambucus nigra-Lectin und den Sialinsäure-Resten des Transferrins.

3. Oxidation eines Chromogens (ABTS) in Anwesenheit eines für Peroxidase spezifischen Substrats, dessen Farbintensität proportional zum Gehalt an der im Transferrin-Molekül enthaltenen Sialinsäure ist und bei 405 nm gemessen wird.

Beispiel 1

Quantitative Bestimmung der Sialinsäure-Reste humaner Isotransferrine (SDT = sialinsäuredefizientes Transferrin) durch eine immunolektinoenzymatische Reaktion unter Verwendung eines Sambucus nigra-Lectin-Konjugats.

a) Reaktionsprinzip

In der ersten Phase wird das Transferrin von den restlichen Serumproteinen durch Anlagerung an einen humanen anti-Transferrin-Antikörper, der auf der Platten-Oberfläche fixiert wurde, abgetrennt.

In der zweiten Phase bilden die an den endständigen Oligosaccharid-Ketten des Transferrins gebundenen Sialinsäure-Reste einen stabilen Komplex mit dem Sambucus nigra-Lectin, welches mit Peroxidase markiert wurde.

Anschließend entwickelt sich durch die Einwirkung eines für Peroxidase spezifischen Substrats auf das Chromogen ABTS in Anwesenheit von Peroxidase eine grün-blaue Färbung, deren Intensität proportional zum Gehalt an Sialinsäure-Resten im Test ist.

b) Erforderliche Reagenzien

- Verdünnungslösung für das Serum:
PBS-Puffer: 0,01 M; pH 7,2- 7,4; 0,05% Tween²⁰ und 1% Albumin (BSA)
- Wasch-Lösung:

- 15 -

- PBS-Puffer: 0,01 M; pH 7,2- 7,4;
- Sambucus nigra-Lectin-Peroxidase Konjugat (kommerziell erhältlich von MEDAC Nr. H6801)
 - Citrat-Pufferlösung Substrat
0,12 M Citratlösung, pH 4,0; 0,05% H₂O₂ (Peridrol)
 - ABTS-Substratlösung
Citrat-Pufferlösung, enthaltend 1,5% ABTS (2,2'-Azino-bis-(3-ethyl)-benzthiazolin-6-sulfonsäure)
 - Stopp-Lösung
Wäßrige 1 %ige Natriumdodecylsulfat-Lösung
 - Beschichtete Mikrotiterplatte mit anti-Transferrin-Antikörpern (Human anti-Transferrin-Antikörper aus Host animal, whole serum (Sigma Nr. T2027))

c) Vorbereitung der Mikrotiterplatten

c1) Vorbereitung der anti-Transferrin-Antikörper

- Zu 4 ml anti-Transferrin-Antikörper Serum wird tropfenweise 2 ml gesättigte Ammoniumsulfatlösung [(NH₄)₂SO₄, MG 132,14, 900 g/l bidest. H₂O] zugegeben und mit einem Glasstäbchen vermischt.
- 60 min bei 4°C stehen lassen.
- 15 min bei 4°C zentrifugieren.
- Überstand verwerfen und das Präzipitat in 2 ml PBS-Puffer (0,01 M; pH 7,2- 7,4) resuspendieren; diese letzten beiden Schritte 4 x wiederholen.
- Das letzte Präzipitat in 1 ml PBS-Puffer resuspendieren und in Dialysevorrichtung einbringen (Dialysemembran: Fa. Serva, Heidelberg, Dialysis tubing Nr. 20/32, Best.Nr. 44110).
- Dialyse bei 4°C gegen PBS-Pufferlösung, die nach jeweils zwei Stunden erneuert wird, bis diese auf Nessler-Reagenz (Nessler-Reagenz auf Ammoniumsalze, Merck-Nr. 1.09028) negativ reagiert.
- Anschließend Bestimmung der Proteinkonzentration des gereinigten anti-Transferrin-Antikörpers nach Biuret (Soll-Konzentration ca. 20-50 mg/ml).

- 16 -

c2) Plattenbeschichtung

Die Polystyrol-Mikrotiterplatten werden mit 100 μ l der hochgereinigten Lösung der polyklonalen anti-Transferrin-Antikörper (IgG) beschichtet. Zur Plattenbeschichtung soll die Endkonzentration der Lösung 20 mg Protein/ml in Carbonat-Pufferlösung (0,1 M, pH 9,6) betragen. Die Fixierung erfolgt bei 24-stündiger passiver Inkubation bei 4°C ohne Schüttler. Die Platten werden 3 mal mit der Waschlösung gewaschen und bei minus 20°C aufbewahrt.

d) Vorbereitung des Testserums:

Die Seren werden 1/10 mit der Verdünnungslösung verdünnt (100 μ l + 900 μ l).

e) Vorbereitung der Standards und Kontrollen

Die Serum-Standards mit 25, 20, 10, 5, 2,5 μ mol SSR/dl (SSR = Sialinsäurereste) und das Kontrollserum mit 20 μ mol SSR/dl werden mit 0,5 ml bidestilliertem Wasser rekonstituiert.

f) Einsatz der Proben, Standards und Kontrollen

Eine Doppelbestimmung pro Test ist empfohlen. Je 100 μ l der vorbereiteten Lösungen in die Plattenvertiefungen pipettieren. Für den Leerwert 100 μ l der Verdünnungslösung in 2 Plattenvertiefungen pipettieren; 30 min bei Raumtemperatur bei gleichzeitigem Rütteln der Platte inkubieren.

Nach drei aufeinanderfolgenden Waschungen (immer bei den Leerwerten beginnen!) wird die feuchte Platte auf saugfähigem Papier vorsichtig abgeklopft.

g) Einsatz des Sambucus nigra-Lectin-Konjugats

Die Plattenvertiefungen werden mit 100 μ l Konjugat-Lösung beschickt und 30 min bei Raumtemperatur und gleichzeitigem Rütteln der Platte inkubiert. Das spezifische Konjugat bildet mit den Sialinsäure-Resten, die parallel zum Transferrin/anti-Transferrin gebunden sind, einen stabilen Komplex. Nach drei aufeinanderfolgenden Waschungen wie zuvor

- 17 -

wird die feuchte Platte auf saugfähigem Papier vorsichtig abgeklopft.

h) Einsatz des Substrats und des Chromogens

Die Plattenvertiefungen werden mit 100 μ l ABTS-Substratlösung beschickt und 10 min bei Raumtemperatur und gleichzeitigem Rütteln der Platte inkubiert. Die Reaktion erfolgt mit einer grün-blauen Färbung des oxidierten Chromogens.

Die kinetische Messung dieser Reaktion erfolgt in 3 Punktmessungen im Zeitintervall von 5 min nach 10-minütiger Anfangsinkubation; die Reaktion kann durch Zugabe von 50 μ l Stopp-Lösung (1% SDS) für eine Endpunktmessung nach 30 min gestoppt werden. Alternativ kann lediglich eine Endpunktmessung nach 30-minütiger Inkubation durchgeführt werden.

i) Messung

bei 405 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer

j) Auswertung

Die Auswertung erfolgt mit einer zu erstellenden Konversionskurve:

1. Logarithmische Standard-Kurve

Die erhaltenen Extinktionsdifferenzen der Standards werden nach folgender Formel dezimal-logarithmisch gegen die dezimal-logarithmischen Standardkonzentrationen aufgetragen:

$$\text{Log. } \Delta E_{\min} = \text{Log } \mu\text{mol/dl SSR}$$

2. Sigmoide Standard-Kurve

Die erhaltenen Extinktionsdifferenzen der Standards werden nach folgender Formel dezimal-logarithmisch gegen die Standardkonzentrationen aufgetragen:

- 18 -

$$\text{Log. } \Delta E = \frac{(a-d)}{[1 + (x/c)^b]} + d \text{ } \mu\text{mol/dl SSR}$$

Das Kontrollserum mit 20 μmol SSR/dl sollte Extinktionsdifferenzen in folgenden Bereichen ergeben:

0,276 \pm 10 % nach 15' (0,248 - 0,304)

0,426 \pm 10 % nach 30' (0,383 - 0,492)

0,528 \pm 10 % nach 60' (0,475 - 0,581)

Beispiel 2

Beispiel 1 wird wiederholt, außer daß anstelle des Sambucus nigra-Lectin-Peroxidasekonjugats biotinyliertes Sambucus nigra-Lectin (Fa. MEDAC, Nr. BA 6801) und ein Streptavidin-Peroxidasekonjugat verwendet wird.

Dazu werden in Schritt (g) 100 μl einer Lösung von biotinyliertem Lectin die Plattenvertiefungen pipettiert, 30 min bei Raumtemperatur und gleichzeitigem Rütteln der Platte inkubiert und nach dreimaligem Waschen je 100 μl Peroxidase-Streptavidin Konjugat Lösung zupipettiert, erneut 30 min bei Raumtemperatur unter Rütteln inkubiert und wie zuvor dreimal gewaschen.

Das Kontrollserum mit 20 μmol SSR/dl sollte Extinktionsdifferenzen in folgenden Bereichen ergeben:

0,353 \pm 10 % nach 15' (0,318 - 0,388)

0,546 \pm 10 % nach 30' (0,491 - 0,601)

0,572 \pm 10 % nach 60' (0,515 - 0,629)

Beispiel 3

Herstellung eines Transferrin-freien Standards

Materialien

- Lectin Conavalin A (Con A) aus *Conavalia ensiformis* (Jack bean) (Sigma Nr. C7275)
- N-Acetylneuramin-Lacto-N-neo-Tetraose c (α Neu 5 AC-(2-6 β Gal-(1-4)- β GlcNAc-(1-3)- β Gal-(1-4)-Glc, Natriumsalz, a u s Humanmilch, MG: 1020,9 g/mol (Sigma Nr. A4814)

Nach Sättigung von Lectin Con A (spezifisch für α -D-Glycosyl-Bindungen) mittels Sialinsäureresten in verschiedenen Konzentrationen (6-Punkt-Kalibration) wird eine Mikrotiterplatte mit dem gesättigten Lectin bzw. Komplex beschichtet. Bindung von *Sambucus nigra*-Lectin und Reaktion mit Substrat erfolgt wie in Beispiel 1, Schritt g) und h) beschrieben.

Alternativ wird zur Herstellung der Transferrin-freien Standards zunächst Lectin Con A im Überschuß auf der Mikrotiterplatte fixiert. Anschließend werden die Sialinsäurereste in den Konzentrationen 200, 100, 50, 25, 12,5 und 6,25 20 μ mol SSR/l zu dem fixierten Lectin zupippettiert.

Beispiel 4 Vergleich

Für gesunde Männer und Frauen (nicht Schwangere) wird in der Literatur ein physiologischer Transferringehalt von 260 mg/dl (221-299 mg/dl) angegeben. Unter Zugrundelegung von Molekulargewichten von 77.000 g/Mol für Transferrin und von 308,3 g/Mol für SSR und durchschnittlich 5 SSR pro Transferrinmolekül errechnet sich daraus eine SSR-Konzentration im Bereich von etwa 14,35 μ mol/dl bis 19,42 μ mol/dl.

Als durchschnittlicher SSR-Serumgehalt für eine gesunde Kontrollgruppe wurde ein Wert von 50,51 μ mol SSR/g Transferrin ermittelt (Stibler et al., Clinical and Experimental Research,

- 20 -

Vol 10, No. 1, Jan/Feb 1986). Daraus ergeben sich unter Berücksichtigung einer relativen Abweichung vom Transferrin-Sollwert (ca. 260 mg/dl) von $\pm 15\%$ für den ermittelten Wert von 50,51 $\mu\text{mol SSR/g}$ Transferrin folgende Bereiche:

	niedriger Bereich	hoher Bereich
$\mu\text{mol SSR/g}$ Transferrin	42,94	58,08
$\mu\text{mol SSR/dl}$	12,83	17,36
erfindungsgemäß berechnet (s.o)	14,35	19,42
gemessen	14,18	19,33

Diese Ergebnisse zeigen, daß die Quantifizierung von Transferrin mit dem erfindungsgemäßen Verfahren zu Werten führt, die in guter Übereinstimmung zu berechneten und den in der Literatur veröffentlichten Werten stehen.

Die vorstehende Quantifizierung wurde durchgeführt gemäß dem Verfahren von Beispiel 1. Als Standard wurde Mucin mit deklariertem Gehalt von α -anomerischen (2-6) Sialinsäureresten (Sigma No. M3895, Mucin von Bovine Submaxillary Glands) in Konzentrationen von 25, 20, 15, 10, 5 und 2,5 $\mu\text{mol SSR/dl}$ verwendet.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung endständiger Sialinsäurereste von Human-Transferrin in einer Probenflüssigkeit nach einem Sandwich-Prinzip,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die Probenflüssigkeit mit einem ersten, spezifisch mit Human-Transferrin bindefähigen Rezeptor inkubiert, den gebildeten Komplex von der Probenflüssigkeit abtrennt, mit einem zweiten, spezifisch mit endständigen Sialinsäureresten von Human-Transferrin bindefähigen Rezeptor inkubiert, wobei der zweite Rezeptor an eine Markierung gebunden oder damit bindefähig ist, und den Komplex aus erstem Rezeptor, Human-Transferrin und zweitem Rezeptor über die Markierung bestimmt.
2. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß der erste Rezeptor ein anti-Transferrin-Antikörper ist.
3. Verfahren nach Anspruch 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß der erste Rezeptor ein polyklonaler anti-Transferrin-Antikörper ist.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß der zweite Rezeptor ein Lectin ist.
5. Verfahren nach Anspruch 4,
dadurch gekennzeichnet,
daß der zweite Rezeptor Sambucus nigra-Lectin ist.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,

- 22 -

dadurch gekennzeichnet,
daß der erste Rezeptor an eine Festphase gebunden ist
oder mit einer Festphase bindefähig ist, wobei
mindestens eine Inkubation oder/und Abtrennung des
Komplexes in Gegenwart der Festphase durchgeführt wird.

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Festphase die Wand eines Reaktionsgefäßes ist,
ausgewählt aus Probenröhrchen, Mikrotiterplatte und
Küvette, oder ein teilchenförmiges Material ist.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche ,
dadurch gekennzeichnet,
daß der zweite Rezeptor biotinyliert ist und die
Markierung an Streptavidin/Avidin gekoppelt ist.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Markierung eine Enzymmarkierung ist und die
Bestimmung der Markierung die Bestimmung eines
chromogenen, lumineszierenden oder fluoreszierenden
Substrats des Enzyms oder einer Substrat-bedingten
Lichtabsorptionsänderung umfaßt.
10. Verfahren nach Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Enzym ausgewählt ist aus Peroxidase, Alkohol-
Dehydrogenase, Glucose-6-Dehydrogenase oder Diaphorase.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Markierung eine Fluoreszenz- oder
Lumineszenzmarkierung ist.
12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,

- 23 -

daß die Probenflüssigkeit eine Human-Körperflüssigkeit ist.

13. Verfahren nach Anspruch 12,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Human-Körperflüssigkeit ausgewählt wird aus Serum und Vollblut.
14. Verfahren zur Bestimmung von Sialinsäure-defizientem Human-Transferrin in Körperflüssigkeiten,
dadurch gekennzeichnet,
daß man
 - (a) an einer Probe einer Körperflüssigkeit eine Bestimmung nach einem Verfahren eines der vorhergehenden Ansprüche durchführt,
 - (b) eine Bestimmung von endständigen Sialinsäureresten an mindestens einem Standard durchführt, der eine Substanz, umfassend mit dem zweiten Rezeptor bindefähige Sialinsäurereste in definierter Menge enthält, und
 - (c) den Gehalt von Sialinsäure-defizientem Transferrin in einer Körperflüssigkeit auf Basis der Meßgrößen von Schritt (a) und Schritt (b) ermittelt.
15. Verfahren nach Anspruch 14,
dadurch gekennzeichnet,
daß man Schritt (b) mit drei bis sieben Standards, die jeweils eine unterschiedliche Menge von mit dem zweiten Rezeptor bindefähigen Sialinsäureresten enthalten, durchführt und eine Eichkurve erstellt.
16. Verfahren nach Anspruch 14 oder 15,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Standard Transferrin mit einer definierten Menge von Sialinsäureresten enthält.
17. Verfahren nach Anspruch 14 oder 15,
dadurch gekennzeichnet,

- 24 -

daß der Standard eine von Transferrin verschiedene Substanz mit einer definierten Menge von Sialinsäureresten enthält.

18. Verfahren nach Anspruch 17,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Substanz ein festphasenseitiges Mucin oder/und ein festphasenseitiges Oligosaccharid mit definiertem Gehalt von mit dem zweiten Rezeptor bindefähigen Sialinsäureresten enthält.
19. Verfahren nach Anspruch 18,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Substanz N-Acetylneuramin-Lacto-N-neo-Tetraose c ist, das an einer mit Concavalin A beschichteten Festphase bindefähig ist.
20. Verfahren zur Diagnose von Alkoholabusus,
dadurch gekennzeichnet,
daß man in einer Probe einer Körperflüssigkeit den Gehalt von Sialinsäure-defizientem Transferrin nach einem Verfahren eines der Ansprüche 14 bis 19 bestimmt und durch Vergleich mit Normalwerten eine pathologische Veränderung ermittelt.
21. Verwendung eines Lectins in einem Verfahren zur Bestimmung von Sialinsäure-defizientem Transferrin.
22. Verwendung nach Anspruch 21,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Lectin Sambucus nigra-Lectin ist.
23. Verwendung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 14 bis 20 zur Diagnose von Alkoholabusus.
24. Verwendung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 14 bis 20 zur Therapieüberwachung bei Entzugspatienten.

- 25 -

25. Verwendung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 14 bis 20 bei der Differentialdiagnose zur Unterscheidung von alkoholinduzierten von alkoholunabhängigen Erkrankungen.
26. Verwendung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 14 bis 20 in der Arbeitsmedizin oder Rechtsmedizin.
27. Reagenzienkit zur Bestimmung endständiger Sialinsäurereste von Human-Transferrin, umfassend in räumlich getrennter Anordnung:
 - (a) festphasenseitigen, mit Human-Transferrin spezifisch bindefähigen ersten Rezeptor,
 - (b) zweiten, spezifisch mit endständigen Sialinsäureresten von Human-Transferrin bindefähigen Rezeptor, der an eine Markierung gebunden oder damit bindefähig ist, und ggf. übliche Hilfs-, Puffer- und Zusatzstoffe.
28. Reagenzienkit nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß der erste Rezeptor ein anti-Transferrin-Antikörper ist.
29. Reagenzienkit nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß der erste Rezeptor ein polyklonaler anti-Transferrin-Antikörper ist.
30. Reagenzienkit nach einem der Ansprüche 27 bis 29, dadurch gekennzeichnet, daß der zweite Rezeptor ein Lectin ist.
31. Reagenzienkit nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, daß der zweite Rezeptor Sambucus nigra-Lectin ist.

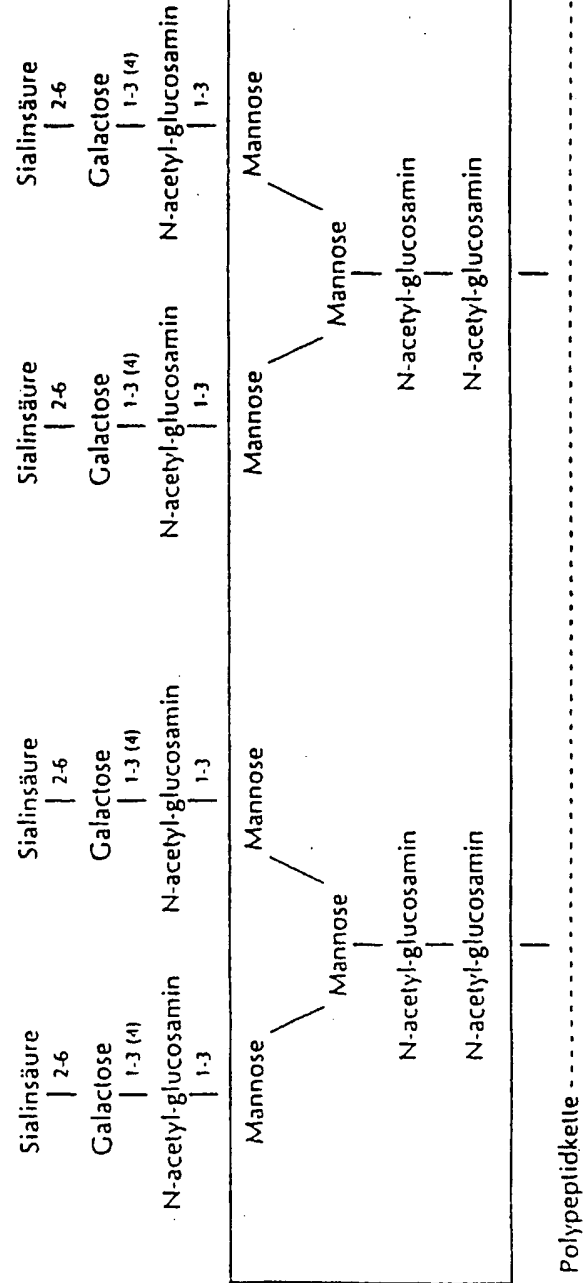
- 26 -

32. Reagenzienkit nach einem der Ansprüche 27 bis 31, weiterhin umfassend einen Standard, der eine Substanz, umfassend mit dem zweiten Rezeptor bindefähige Sialinsäurereste in definierter Menge enthält.
33. Teststreifen zur qualitativen oder semi-quantitativen Bestimmung von Sialinsäure-defizientem Transferrin, umfassend
 - (a) eine Probenauftragszone,
 - (b) mindestens eine Reaktionszone, enthaltend einen an einer Festphase immobilisierbaren ersten Rezeptor, der mit Human-Transferrin spezifisch bindefähig ist, und einen markierten zweiten Rezeptor, der mit endständigen Sialinsäureresten von Human-Transferrin spezifisch bindefähig ist, und
 - (c) eine Nachweiszone zur Immobilisierung von erstem Rezeptor, enthaltend eine mit dem ersten Rezeptor spezifisch bindefähige Substanz.
34. Teststreifen nach Anspruch 33
dadurch gekennzeichnet,
daß der erste Rezeptor ein anti-Transferrin-Antikörper ist.
35. Teststreifen nach Anspruch 34,
dadurch gekennzeichnet,
daß der erste Rezeptor ein polyklonaler anti-Transferrin-Antikörper ist.
36. Teststreifen nach einem Ansprüche 33 bis 35,
dadurch gekennzeichnet,
daß der erste Rezeptor biotinyliert ist und die Nachweiszone Avidin oder Streptavidin umfaßt.
37. Teststreifen nach einem der Ansprüche 33 bis 36,
dadurch gekennzeichnet,
daß der zweite Rezeptor ein Lectin ist.

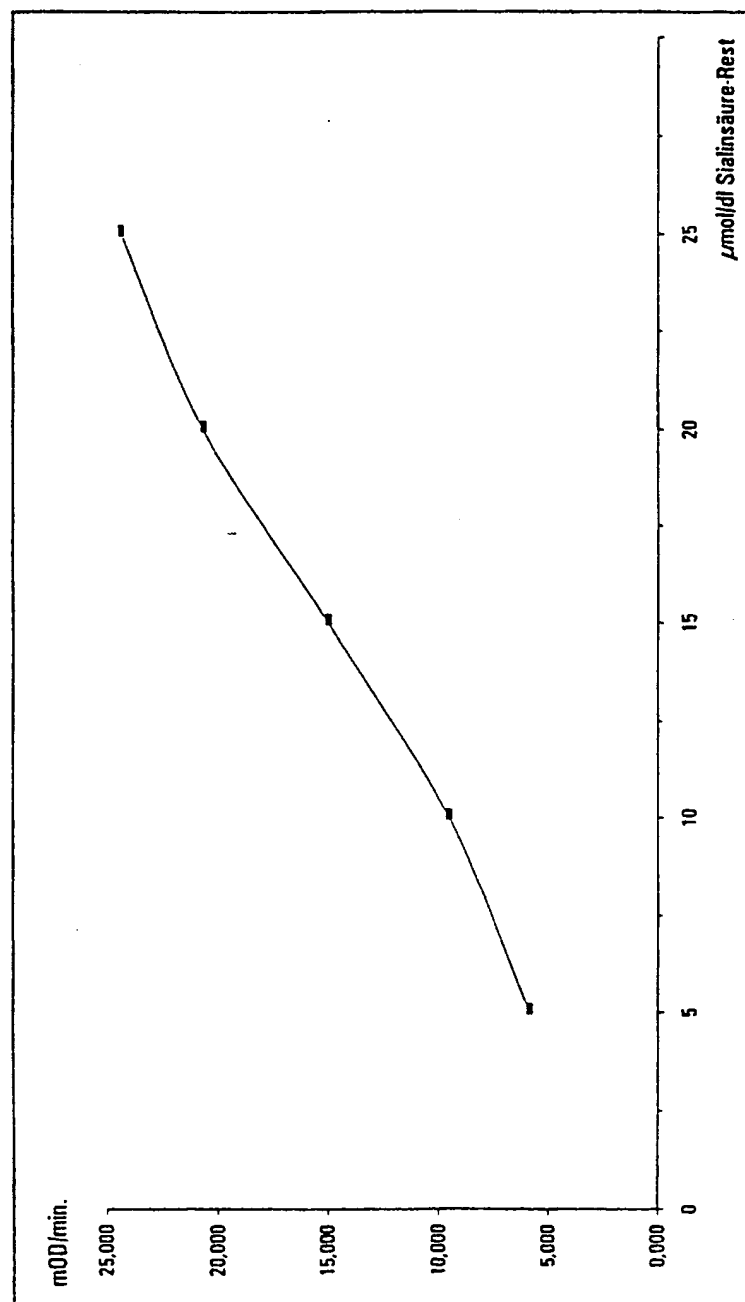
- 27 -

38. Teststreifen nach Anspruch 37,
dadurch gekennzeichnet,
daß der zweite Rezeptor Sambucus nigra-Lectin ist.
39. Teststreifen nach einem der Ansprüche 33 bis 38,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Markierung des zweiten Rezeptors ausgewählt ist
aus Goldmarkierung, Silbermarkierung und Chromogenen.
40. Teststreifen nach einem der Ansprüche 33 bis 39,
weiterhin umfassend mindestens eine Kontrollzone zur
Negativ- oder/und Positivkontrolle.

Tetrasialotransferrin



FIGUR 2



A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 G01N33/68 G01N33/58

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS. (1987), 254(1), 1-8 CODEN: ABBIA4; ISSN: 0003-9861, 1987, XP000646703 SHIBUYA, NAOTO ET AL: "Fractionation of sialylated oligosaccharides, glycopeptides, and glycoproteins on immobilized elderberry (Sambucus nigra L.) bark lectin" vgl. "LSTc" in Table I see page 5 - page 6</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	5,18,19, 22,31,38

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- * "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- * "E" earlier document but published on or after the international filing date
- * "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- * "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- * "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

* "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

* "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

* "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

* "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 April 1997

Date of mailing of the international search report

14.04.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Wells, A

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 122, no. 15, 10 April 1995 Columbus, Ohio, US; abstract no. 182553, MATSUMOTO, KOJIRO ET AL: "Antibody - lectin sandwich enzyme immunoassay for determination of altered asparagine -linked sugar chains in serum transferrin of patients with hepatoma" XP002028961	1-4, 6-17,20, 21, 23-30, 32-37, 39,40
Y	see abstract & RINSHO KAGAKU (NIPPON RINSHO KAGAKKAI) (1994), 23(4), 292-8 CODEN: RIKAA;ISSN: 0370-5633, 1994,	5,18,19, 22,31,38
X	--- ANAL. BIOCHEM. (1987), 165(2), 320-6 CODEN: ANBCA2;ISSN: 0003-2697, 1987, XP000646761 PEKELHARING, J. M. ET AL: "Lectin -enzyme immunoassay of transferrin sialovariants using immobilized antitransferrin and enzyme-labeled galactose-binding lectin from Ricinus communis"	1-4, 6-17,20, 21, 23-30, 32-37, 39,40
Y	see the whole document	5,18,19, 22,31,38
X	--- PROTIDES BIOL. FLUIDS (1984), VOLUME DATE 1983, 31, 115-18 CODEN: PBFA6;ISSN: 0079-7065, 1984, XP000646760 PEKELHARING, J. M.: "An ELISA technique for measurement of transferrin glyco-variants in body fluids using lectins bound to a solid phase"	1-4, 6-17,20, 21, 23-30, 32-37, 39,40
Y	see page 116	5,18,19, 22,31,38
X	--- UPSALA J. MED. SCI. (1981), 86(1), 39-53 CODEN: UJMSAP;ISSN: 0300-9734, 1981, XP000646787 CERVEN, CERIK ET AL: "Determination of terminal sugars in transferrin by radio- lectin immunoassay (RLIA)-a new microanalytical procedure"	1-4, 6-17,20, 21, 23-30, 32-37, 39,40
Y	see the whole document	5,18,19, 22,31,38
A	--- US 4 626 355 A (JOUSTRA MARIUS K ET AL) 2 December 1986 cited in the application & EP 0 172 217 A see claim 1; example 3 ---	1
	--- -/--	

1

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 179 004 A (HASELBECK ANTON ET AL) 12 January 1993 see the whole document -----	1

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4626355 A	02-12-86	SE 440699 B	12-08-85
		AU 3935185 A	27-08-85
		EP 0172217 A	26-02-86
		JP 4031354 B	26-05-92
		JP 61501111 T	29-05-86
		WO 8503578 A	15-08-85

US 5179004 A	12-01-93	DE 3900639 A	28-06-90
		CA 2004642 A	23-06-90
		DE 58907299 D	28-04-94
		EP 0374946 A	27-06-90
		JP 2216055 A	28-08-90
		JP 7065999 B	19-07-95

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 6 G01N33/68 G01N33/58

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 IPK 6 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS. (1987), 254(1), 1-8 CODEN: ABBIA4; ISSN: 0003-9861, 1987, XP000646703 SHIBUYA, NAOTO ET AL: "Fractionation of sialylated oligosaccharides, glycopeptides, and glycoproteins on immobilized elderberry (Sambucus nigra L.) bark lectin" vgl. "LSTc" in Tabelle I siehe Seite 5 - Seite 6 ---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	<p>5,18,19, 22,31,38</p>



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

7. April 1997

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

14.04.97

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Wells, A

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 122, no. 15, 10. April 1995 Columbus, Ohio, US; abstract no. 182553, MATSUMOTO, KOJIRO ET AL: "Antibody - lectin sandwich enzyme immunoassay for determination of altered asparagine -linked sugar chains in serum transferrin of patients with hepatoma" XP002028961	1-4, 6-17,20, 21, 23-30, 32-37, 39,40
Y	siehe Zusammenfassung & RINSHO KAGAKU (NIPPON RINSHO KAGAKKAI) (1994), 23(4), 292-8 CODEN: RIKAA;ISSN: 0370-5633, 1994,	5,18,19, 22,31,38
X	--- ANAL. BIOCHEM. (1987), 165(2), 320-6 CODEN: ANBCA2;ISSN: 0003-2697, 1987, XP000646761 PEKELHARING, J. M. ET AL: "Lectin -enzyme immunoassay of transferrin sialovariants using immobilized antitransferrin and enzyme-labeled galactose-binding lectin from Ricinus communis"	1-4, 6-17,20, 21, 23-30, 32-37, 39,40
Y	siehe das ganze Dokument	5,18,19, 22,31,38
X	--- PROTIDES BIOL. FLUIDS (1984), VOLUME DATE 1983, 31, 115-18 CODEN: PBFPA6;ISSN: 0079-7065, 1984, XP000646760 PEKELHARING, J. M.: "An ELISA technique for measurement of transferrin glyco-variants in body fluids using lectins bound to a solid phase"	1-4, 6-17,20, 21, 23-30, 32-37, 39,40
Y	siehe Seite 116	5,18,19, 22,31,38
X	--- UPSALA J. MED. SCI. (1981), 86(1), 39-53 CODEN: UJMSAP;ISSN: 0300-9734, 1981, XP000646787 CERVEN, CERIK ET AL: "Determination of terminal sugars in transferrin by radio- lectin immunoassay (RLIA)-a new microanalytical procedure"	1-4, 6-17,20, 21, 23-30, 32-37, 39,40
Y	siehe das ganze Dokument	5,18,19, 22,31,38
A	--- US 4 626 355 A (JOUSTRA MARIUS K ET AL) 2.Dezember 1986 in der Anmeldung erwähnt & EP 0 172 217 A siehe Anspruch 1; Beispiel 3 ---	1
	--- -/--	

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>US 5 179 004 A (HASELBECK ANTON ET AL)</p> <p>12. Januar 1993</p> <p>siehe das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1

1

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 4626355 A	02-12-86	SE 440699 B	12-08-85
		AU 3935185 A	27-08-85
		EP 0172217 A	26-02-86
		JP 4031354 B	26-05-92
		JP 61501111 T	29-05-86
		WO 8503578 A	15-08-85

US 5179004 A	12-01-93	DE 3900639 A	28-06-90
		CA 2004642 A	23-06-90
		DE 58907299 D	28-04-94
		EP 0374946 A	27-06-90
		JP 2216055 A	28-08-90
		JP 7065999 B	19-07-95

THIS PAGE BLANK (USPTO)